

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



| | | |
|---|-----------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : G01N 33/68</p> | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07036 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Februar 1998 (19.02.98)</p> |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04396 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. August 1997 (13.08.97) (30) Prioritätsdaten: 196 32 521.8 13. August 1996 (13.08.96) DE 197 25 362.8 16. Juni 1997 (16.06.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHRADER, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen- Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). OPITZ, Hans-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</p> | | <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p> |
| <p>(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING THE STATUS OF AN ORGANISM BY PEPTIDE MEASUREMENT (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERFASSUNG DES STATUS EINES ORGANISMUS DURCH MESSUNG VON PEPTIDEN (57) Abstract A process is disclosed for determining the status of an organism by measuring peptides in a sample of the organism which contains high-molecular and low-molecular peptides and acts as an indicator of the organism status. Low-molecular peptides are directly sensed and characterised, and are then correlated with a reference. (57) Zusammenfassung Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hoch- und niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauritanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Verfahren zur Erfassung des Status eines
Organismus durch Messung von Peptiden

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus.

Zur Erfassung des Status eines Organismus werden verschiedene analytische Methoden eingesetzt. So wird beispielsweise in der Diagnostik von höheren Organismen bei pathologischen Befunden aufgrund der Symptomatik versucht, die Ursache der pathologischen Veränderung zu ergründen, um eine kausale Therapie zu entwickeln. Desweiteren ist man bemüht, durch Sequenzierung der Genome von Organismen und Etablierung von "Wildtyp-Genomen" eine Referenz eines durchschnittlichen, "gesunden" Organismus zu entwickeln, um dann individuelle Abweichungen, die auf mögliche pathogene Entwicklungen hinweisen können, durch entsprechende Genanalysen zu entdecken. Nachteilig an dem ersten methodischen Ansatz ist, daß man keine hypothesenfreie Diagnostik durchführen kann, da dabei eine Diagnose unternommen wird, die bereits auf Vermutungen beruht. Nachteilig an dem zweiten Verfahren ist, daß es auf lange Sicht noch nicht möglich sein wird, wichtige

- 2 -

oder gar alle auf genetische Fehlfunktionen zurückzuführende Erkrankungen zu diagnostizieren. Ein weiterer Nachteil der zuletzt genannten Methode kann auch darin bestehen, daß eine Mutation auf einem Gen nicht unbedingt zur Expression des damit verbundenen Phänotypen führt.

Es wäre mithin wünschenswert, über ein universell einsetzbares diagnostisches Verfahren zu verfügen, mit welchem es gelingt, die geschilderten Nachteile zu vermeiden und insbesondere eine hypothesenfreie Diagnostik durchführen zu können. Das diagnostische Verfahren sollte darüber hinaus universell einsetzbar sein, nicht beschränkt bleiben auf höher entwickelte Systeme, sondern auch gleichfalls einsetzbar sein, um den Status von niederen Organismen zu erfassen. Es sollte darüber hinaus leicht etablierbar sein und mit an sich bekannten Techniken ausgeführt werden können.

Ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem liegt mithin in der Bereitstellung eines solchen Verfahrens.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem in einfacher Weise durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus geht davon aus, daß dem zu untersuchenden Organismus eine Probe entnommen wird. Die Probe kann auch der vollständige Organismus sein. Die Probe muß niedermolekulare Peptide enthalten, wobei es nicht stört, wenn die Probe neben niedermolekularen Peptiden auch hochmolekulare Peptide oder Proteine enthält. Die niedermolekularen Peptide werden dabei erfindungsgemäß direkt erfaßt und charakterisiert und dienen als Indikator für den Status des Organismus. Dabei ist es sowohl möglich, einzelne Peptide direkt meßtechnisch zu erfassen, mehrere Peptide meßtechnisch zu

erfassen bis hin zu allen in der Probe befindlichen und meßtechnisch erfaßbaren niedermolekularen Peptide. Anders als bei herkömmlichen analytischen oder diagnostischen Methoden, wie die Gel-Elektrophorese oder die zweidimensionale Elektrophorese und beispielsweise klinische diagnostische Methoden, werden hier nicht die hochmolekularen Strukturen, wie beispielsweise Proteine untersucht. Im Gegensatz zu an sich bekannten diagnostischen Methoden, wie beispielsweise Radioimmunoassay oder anderen Kompetitionsassays zur Messung von Peptidhormonen und ähnlichem, werden erfindungsgemäß die niedermolekularen Peptide direkt meßtechnisch erfaßt und nicht wie in den genannten Methoden indirekt. Als Referenz dient die Verteilung niedrigmolekularer Peptide bei einem repräsentativen Querschnitt von definierten Kontrollen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die zu untersuchende Probe von Geweben- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus, dessen Status aufgenommen werden soll, stammen oder es kann der Organismus selbst oder Teile davon sein. Im Falle der Untersuchung niederer Organismen dient vorzugsweise der Organismus selbst als Probe. Als niedere Organismen kommen insbesondere Einzeller, wie prokaryontische Systeme oder einfache eukaryontische Systeme, wie Hefen oder andere Mikroorganismen, in Betracht.

Erfindungsgemäß sollen die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 30.000 Dalton aufweisen. Die untere Grenze ist an sich nicht kritisch, jedoch stellen Dipeptide die untere Grenze der niedrigmolekularen Peptide, die erfindungsgemäß erfaßt werden sollen, dar. Insbesondere bevorzugt sind Molekulargewichte der niedrigmolekularen Peptide von 100 bis 10.000 Dalton.

Falls erforderlich, weil beispielsweise durch eine veränderte Meßanordnung bedingt, kann es vorteilhaft sein, hochmole-

kulare Peptide oder Proteine sowie andere Biopolymere, die möglicherweise mit der Messung interferieren, aus der Probe zu entfernen. Dies ist insbesondere dann nicht erforderlich, wenn durch die erfindungsgemäß einzusetzende Meßmethode die höhermolekularen Peptidverbindungen meßtechnisch nicht erfaßt werden.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß die Massenspektroskopie zur Erfassung der niedermolekularen Peptide eingesetzt. Insbesondere bewährt hat sich dabei die sogenannte MALDI-Methode (Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie). Wird die Massenspektrometrie als Methode eingesetzt, empfiehlt es sich, die durch die Massenspektroskopie ermittelbaren Daten zur Charakterisierung der niedermolekularen Peptide einzusetzen, wie beispielsweise deren Molekulargewicht. Es ist ebenfalls möglich, unter bestimmten Umständen andere Parameter zu analysieren, wie beispielsweise die Ladung der Peptide oder die charakteristische Retentionszeit auf Chromatographiesäulen oder ein Fragmentmuster der niedermolekularen Peptide oder Kombinationen aus Masse der niedermolekularen Peptide und deren Ladungen.

Je nach Fragestellung, die mit der Erfassung des Status des Organismus noch verbunden ist, kann es vorteilhaft sein, die Probe auf mehrere Fraktionen zu verteilen und die Proben unter verschiedenen Fragestellungen oder meßtechnischen Anordnungen zu analysieren und somit einen Status des Organismus zu erfassen.

Als Organismen dienen insbesondere Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen von Tieren und Menschen. So wird es erfindungsgemäß ermöglicht, den Status von genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen zu untersuchen. Dies kann insbesondere bei Überprüfungen von transformierten Systemen vorteilhaft sein, um zu erkennen, inwie-

- 5 -

weit transformierte Organismen möglicherweise unerwartete oder unerwünschte Eigenschaften entwickelt haben, indem beispielsweise Peptide gebildet werden, die auf unerwünschte oder unerwartete Eigenschaften, wie toxische Eigenschaften, hinweisen.

Insbesondere kann jede bewußt oder unbewußt vorgenommene Manipulation (Konditionierung) eines Organismus dessen Status beeinflussen, sei es im Rahmen der Verabreichung von Medikamenten, der Gentherapie, bei Infektionen, am Arbeitsplatz durch Kontakt mit chemischen Stoffen, bei Versuchstieren, insbesondere transgenen Tieren und knock-out-Mutanten. Insbesondere bei solchen Verfahren kann durch den intra- und inter-individuellen Vergleich, beispielsweise durch chronologische Probenentnahme aus einem Organismus vor und im Verlauf einer der oben genannten Maßnahmen oder durch Vergleich mit nicht behandelten Kontrollorganismen, überprüft werden, ob die vorhergesagten, erwünschten Änderungen im Status tatsächlich eingetreten sind und ob darüberhinaus oder stattdessen nicht vorhergesagte, unerwünschte oder auch erwünschte Änderungen eingetreten sind, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hypothesenfrei erfaßt werden.

Daher eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zum Beispiel zur Begleitung von klinischen Studien, toxikologischen Untersuchungen bei der Erprobung von Medikamenten aller Art, zur Analyse/Erfassung von Abbauprodukten, zur Identifikation von Genprodukten.

In der Veterinär- und Humanmedizin entwickelt das erfindungsgemäße Verfahren seine überragende Bedeutung dadurch, daß eine hypothesenfreie Erfassung des Status des betreffenden Organismus ermöglicht wird. Es wird also nicht bereits mit einer vorgefaßten Meinung ein Bestätigungssassay durchgeführt, sondern es wird ein echtes Gesamtbild des Status des untersuchten Organismus erstellbar. Das erfindungsgemäße Verfahren, daß als differentielles Peptiddisplay (Differential

Peptide Display) bezeichnet werden kann, geht dabei davon aus, daß in einem gesunden Organismus ein bestimmtes Peptidmuster vorhanden ist und deshalb in der Lage ist, als Referenzstandard zu dienen. Nimmt man nun den Peptidstatus eines Individuums auf und vergleicht diesen mit der Referenz, so kann man einerseits Abweichungen feststellen, die bereits einen ersten Hinweis auf einen möglicherweise pathogenen Zustand geben. Werden nunmehr die Abweichungen, die durch Vergleich mit ähnlichen pathogenen Zuständen erstellt worden sind, aus entsprechenden Proben eines Erkrankten ermittelt, so kann bereits durch Vergleich der Abweichungen im Peptidmuster der Probe des Individuums und Übereinstimmung der Abweichung mit einem zugeordneten Krankheitsbild die betreffende Erkrankung direkt aus der Analyse identifiziert werden.

Erfindungsgemäß kann dabei insbesondere wie folgt vorgegangen werden. Zur Herstellung einer Referenzprobe können zunächst Ultrafiltrate aus Körperflüssigkeiten und Gewebsextrakten verwendet werden. Die Gewinnung der Filtratpeptide und ihre Auftrennung in Fraktionen erfolgt, indem beispielsweise niedrigmolekulare Peptidfraktionen gewonnen werden. Die Charakterisierung der Peptidfraktionen kann beispielsweise anhand von Retentionsverhalten und molekularer Masse, ermittelbar durch Chromatographie oder Massenspektroskopie, erfolgen. Wird beispielsweise Ultrafiltrat von Patienten, die an einer bekannten Erkrankung leiden, verwendet und dieses mit dem zuvor erstellten Spektrum von gesunden Referenzprobanden verglichen, kann durch das abweichende Muster eine Zuordnung der spezifischen Erkrankung mit dem Status des betreffenden Peptidgemisches erfolgen. Die Methode kann somit auch in an sich herkömmlicher Weise eingesetzt werden, indem beispielsweise gleich das entsprechende auf pathogene Veränderungen hinweisende Peptidmuster abgefragt wird. Im Einzelfall kann dies sogar ein für die entsprechende Krankheit charakteristisches Peptid sein. Analysiert man z. B. eine Probe aus einem Patienten, bei dem ein bestimmtes

- 7 -

Erkrankungsbild erkennbar ist und eine Hypothese für die Ursache dieser Erkrankung besteht, kann beispielsweise dieses spezifische Peptid in der Analyse gemäß Erfindung ebenfalls abgefragt werden und bei positivem Ausgang entsprechende Therapiepläne eingerichtet werden. So ist es durchaus möglich, zunächst dem Patienten eine Probe zu entnehmen, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einen Status aufzunehmen, um dann bei Feststellen des Vorliegens einer auf pathogene Zustände hinweisenden Abweichung entweder durch an sich bekannte Bestätigungsassays, unter Heranziehung der üblichen klinischen Assays, eine Kontrollmessung durchzuführen oder die Kontrollmessung durch spezifisches Screening nach dem Indikator des pathogenen Zustands durchzuführen.

Peptide können dabei nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise Ultrafiltration des entsprechenden Ausgangsmaterials, gewonnen werden. Dabei werden Filter mit einer molekularen Ausschlußgröße verwendet, die in dem erfindungsgemäß beanspruchten Bereich liegen, also zwischen denen eines Dipeptides und maximal 30.000 Dalton. Durch geeignete Wahl der jeweiligen Membranen können auch bestimmte Molekulargewichtsfractionen gewonnen werden. Vorzugsweise werden im Rahmen der Filtration 0,2 ml bis 50 l Filtrat gewonnen, das beispielsweise sofort nach Abschluß der Filtration durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 bis 4 eingestellt wird. Die genannten Mengen dienen insbesondere dazu, gepoolte Proben zu untersuchen, zum einen zur Entwicklung von Referenzproben gesunder Probanden bzw. zur Bestimmung krankheitsspezifischer Peptidmarker zur Erstellung einer Peptiddatenbank.

Die nach Ultrafiltration im Filtrat vorliegenden Peptide werden durch Adsorption an chromatographische Materialien, insbesondere Kationenaustauscher, wie beispielsweise Fractogel, Anionenaustauscher-Fractogel TMAE und Reverse-Phase-(RP)-Materialien, mit nachfolgender Elution durch lineare Gradienten oder Stufengradienten gewonnen. Zur weiteren

- 8 -

Aufreinigung können gegebenenfalls weitere chromatographische Trennungen, insbesondere über RP-Phasenmaterial durchgeführt werden.

Die Erfassung der Peptidfraktionen erfolgt vorzugsweise durch massenspektrometrische Analyse, insbesondere mit der MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry) oder ESI-MS (electro spray ionisation-MS). Dies sind Methoden, die zur Analyse von Peptiden einsetzbar sind. Hierbei wird vorzugsweise mit einer On-Line-Kopplung einer Microbore RP-Trennung und der Massenspektrometrie (LC-MS-Kopplung) gearbeitet. Aus den erhaltenen Daten wird eine mehrdimensionale Tabelle nach Retentionsverhalten, Molekulargewicht und Signalintensität als bevorzugte Leitparameter erstellt. Es können jedoch auch andere mit den genannten Methoden ermittelbare Größen erfaßt werden.

Die über die vorgenannten Schritte gewonnenen Daten über Patienten mit einer bekannten Grunderkrankung werden mit den gleichartig gewonnenen Daten einer gesunden Referenzpopulation verglichen. Hierbei werden sowohl qualitative Änderungen (z. B. das Auftreten neuer Peptide oder das Fehlen von Peptiden), als auch quantitative Änderungen (das vermehrte beziehungsweise verminderte Auftreten von einzelnen Peptiden) festgestellt. Die über die vergleichende Analyse definierten Targets können, falls erforderlich, im weiteren durch den Fachmann bekannte Methoden peptidchemisch gereinigt und identifiziert werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen können dann mit Protein- und Nucleinsäuredatenbanken sowie nachfolgend mit Literaturdaten verglichen werden. Die Relevanz der dargestellten Peptide bezüglich der untersuchten Erkrankung wird überprüft durch funktionelle Studien und durch Reihenscreening an geeigneten Patientengruppen.

Beispiel 1

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Blutfiltrat (Hämo-
filtrat, HF)

1. Gewinnung von HF

HF wird im Rahmen einer arterio-venösen oder auch veno-venösen Hämofiltration nach dem Fachmann bekannten Techniken an ausgewählten Patienten oder Probanden durchgeführt. Die Gewinnung von HF erfolgt in der Weise, wie sie im Prinzip bei chronisch nierenkranken Patienten routinemäßig durchgeführt wird. Über eine arterielle Ableitung und venöse Zuleitung (arterio-venöse HF) oder eine venöse Ableitung mit venöser Zuleitung (veno-venöse HF) wird das Blut des Patienten unter apparativer Unterstützung durch ein Hämo-filtratsgerät (z. B. Hemoprozessor, Sartorius, Göttingen; AK 10 HFM, Gambro, Hechingen) über ein Hämofilter geleitet (z. B. Hemoflow F 60 oder Hemoflow HF 80 S, Fresenius, Bad Homburg; Hemoflow FH 77 H und Hemoflow HF 88 H, Gambro), das eine molekulare Ausschlußgröße von bis zu 30 kDa besitzt. Das dem Patienten entzogene Filtratvolumen wird durch eine Elektrolytlösung substituiert (z. B. SH 01, SH 05, SH 22, SH29, Schiwa, Glandorf).

Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens wird eine diagnostische Hämofiltration mit dem Ziel durchgeführt, zwischen 1 und 30 l HF bei einem Patienten innerhalb einer Hämofiltration zu gewinnen. Das Hämofiltrat wird zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 4 eingestellt und auf 4°C gekühlt.

- 10 -

2. Gewinnung der HF-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Hämofiltrat werden mit entionisiertem Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit Salzsäure auf 2,7 eingestellt. Das HF wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der HF-Peptide werden die gebundenen Peptide mit einer pH-Stufenelution eluiert. Dabei werden 7 Puffer mit aufsteigendem pH verwendet.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214, 280 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Fraktogel TSK SP 650 M (Merck, Darmstadt)

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

| Puffer | pH-Wert | Puffersubstanzen | Molarität |
|------------------|---------|---------------------------|-----------|
| Elutionspuffer 1 | 3,6 | Zitronensäure | 0,1 |
| Elutionspuffer 2 | 4,5 | Essigsäure | 0,1 |
| Elutionspuffer 3 | 5,0 | Apfelsäure | 0,1 |
| Elutionspuffer 4 | 5,6 | Bernsteinsäure | 0,1 |
| Elutionspuffer 5 | 6,6 | Natriumdihydrogenphosphat | 0,1 |
| Elutionspuffer 6 | 7,4 | Dinatriumhydrogenphosphat | 0,1 |
| Elutionspuffer 7 | 9,0 | Ammoniumcarbonat | 0,1 |

Die Eluate 1 - 7 werden separat gesammelt.

- 11 -

2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Eluate 1 - 7 werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäure, 1 cm Durchmesser, 12,5 Füllhöhe

Säulenmaterial: Source RPC 15 μ m (Pharmacia, Freiburg)

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Das Eluat wird in 4 ml-Fractionen gesammelt.

3. Kartierung der Peptid-Fractionen

3.1

Aliquots der in 2.2 gewonnen Fractionen werden auf einer Microbore-Reverse-Phase-Säule aufgetragen und im Gradient eluiert. Die Detektion erfolgt mit UV-Detektor und on-line mit einem Elektrospray-Massenspektrometer.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftragen: 20 μ l/min

Fluß beim Eluieren: 20 μ l/min

Detektion: 220 nm

Säule: C18 AQS, 3 μ m, 120 A, 1 mm Durchmesser, 10 cm Länge (YMC, Schermbeck)

Anlage: ABI 140 B Dual solvent Delivery System

Puffer A: 0,06% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 90 min

- 12 -

On-Line-Massenspektrometrie:

API III mit Elektrospray-Interface (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Positive Ion Modus

Meßbereich: m/z von 300 bis 2.390

Scan-Zeit: 7 sec

Scan-Fenster: 0,25 m/z

Datenerfassung erfolgt mit MacSpec oder MultiView Software (Perkin-Elmer).

3.2 MALDI-MS Messung der einzelnen Fraktionen

Aliquots der in 2.2 gewonnenen Fraktionen werden mit unterschiedlichen Matrixsubstanzen, z. B. unter Zusatz von L(-) Fucose im MALDI-MS gemessen.

Aus den Rohdaten wird eine mehrdimensionale Tabelle erstellt unter Berücksichtigung der Scan-Nummer, Signalintensität und nach Kalkulation der Massen aus den multipel geladenen Ionen eines Scans.

4. Vergleichende Analyse

4.1 Identifikation neuer, fehlender oder in ihrer Menge deutlich verschiedener Peptide

Durch Vergleich der unter 3.3 erhaltenen Datensätze, die auch als Peptidkarten bezeichnet werden können, werden qualitative und/oder quantitative Unterschiede festgestellt. Dabei werden unter Berücksichtigung von Kontrollen und Proben einzelne Datensätze oder auch Gruppen von Datensätzen zum Vergleich herangezogen.

4.2 Peptidchemische Charakterisierung der identifizierten Targets

Aus dem gewonnen Rohmaterial (z. B. Großpräparationen von Hämofiltrat) werden die identifizierten Targets in Mengen aufgereinigt, die eine Identifikation erlauben. Dazu werden die unterschiedlichen, dem Fachmann bekannten chromatographischen Trenntechniken (Reverse Phase, Ionenaustausch, Ausschlußgrößenchromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie etc.), die im allgemeinen zur Auftrennung von Peptidgemischen eingesetzt werden, verwendet. Nach jeder chromatographischen Trennung einer Fraktion werden über ESI-MS, MALDI-MS oder auch LC-MS die Targets erneut in den Fraktionen identifiziert. Dieses Procedere wird unter Variation der chromatographischen Parameter so oft wiederholt, bis ein reines Produkt der gesuchten Spezifikation, d. h. Retentionszeit und molekularer Masse, vorliegt. Darauf folgt die Bestimmung einer Teil- oder Komplet-Aminosäuresequenz oder eines Fragmentmusters. Im Anschluß wird ein Datenbankvergleich durchgeführt an den bekannten Datenbanken (Swiss-Prot und EMBL-Peptid- und Nucleinsäure-Datenbank) mit dem Ziel der Identifikation der Teil- oder Kompletsequenz oder eines Fragmentmusters. Ist kein Datenbankeintrag vorhanden, erfolgt die Aufklärung der Primärstruktur.

Beispiel 2:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Aszites

1. Gewinnung von Aszites

Aszites bildet sich als extravasales Exsudat bei unterschiedlichen Erkrankungen (maligne Tumoren, Leberstörungen etc.). Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens werden zwischen 10 ml und 10 l Aszites durch Punktion gewonnen und danach zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 einge-

- 14 -

stellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

2. Gewinnung der Aszites-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

2.1. Peptidextraktion mit Gradienten-Elution

5 l Aszites-Filtrat werden auf pH 2,0 eingestellt und über eine präparative Reverse-Phase-Säule getrennt.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag 40 ml/min

Fluß beim Eluieren: 40 ml/min

Detektion: 214 nm, 280 nm

Säule: Waters Kartuschensystem, 4,7 cm Durchmesser, 30 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Vydac RP-C18, 15 - 20 µm

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 3.000 ml

Das Eluat wird in 50 ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

Beispiel 3:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Urin

1. Gewinnung von Urin

Urin wird direkt als Katheterurin oder als Spontanurin von Patienten in Mengen von 0,5 bis 50 l gewonnen und zur Ver-

- 15 -

meidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 eingestellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

2. Gewinnung der Urin-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Urin-Filtrat werden mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit HCl auf 2,7 eingestellt. Das Urin-Filtrat wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der Peptide werden die gebundenen Peptide mit einem Kochsalzgradienten eluiert.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Merck Fraktogel TSK SP 650 M

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 50 mM NaH_2PO_4 pH 3,0

Puffer B: 1,5 M NaCl in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 2.000 ml

Das Eluat wird in 10 Pools á 200 ml gesammelt.

- 16 -

2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Fraktionen werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäule, 1 cm Durchmesser, 12,5 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Pharmacia Source RPC 15 μ m

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 200 ml

Das Eluat wird in 4ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

- 17 -

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hoch- und niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei
 - niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und
 - mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe Gewebe- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus oder der Organismus selbst oder Kombinationen davon ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von höchstens 30 000 Dalton aufweisen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, mindestens ein Molekulargewicht, das dem von Dipeptiden entspricht, aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 3 und/oder 4, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von 100 bis 10 000 Dalton aufweisen.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die hochmolekularen Peptide vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide abgetrennt werden oder meßtechnisch oder auswertetechnisch bei der Erfassung der Probe nicht berücksichtigt werden.

- 18 -

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Erfassung der niedrigmolekularen Peptide durch Massenspektrometrie erfolgt.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die niedrigmolekularen Peptide durch die Messung ihres Molekulargewichtes charakterisiert werden.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Probe vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide in verschiedene Fraktionen aufgeteilt wird und unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wird.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei als Organismus Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen aus Tieren und Menschen dienen.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Probe aus genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen stammt.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Erfassung des Status des Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus, zur Aufdeckung eventueller Abweichungen von einem Referenzzustand, dient.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Erfassung des Status eines transformierten Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus zur Aufdeckung von Veränderungen des transformierten Organismus dient, zur Aufdeckung von mit der Transformation verbundenem Auftreten von Peptiden, die kausal mit Stoffwechselveränderungen zusammenhängen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter.inales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04396

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341-345, XP002050736 | 1,2,10, 12 |
| A | siehe das ganze Dokument | 3-9,11, 13 |
| X | M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124-129, XP002050737 | 1,2,10, 12 |
| A | siehe das ganze Dokument | 3-9,11, 13 |

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| T | <p>C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, Bd. 94, Nr. 17, 1997, BETHESDA MD USA, Seiten 9481-9486, XP002050738 siehe Seite 9481, Spalte 1, Zeile 1 - Spalte 2, Zeile 19</p> <p>-----</p> | 1-13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 97/04396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, vol. 6, no. 3, 1987, NEW YORK NY USA, pages 341-345, XP002050736 | 1, 2, 10, 12 |
| A | see the whole document | 3-9, 11, 13 |
| X | M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 275, no. 2, 1983, BERLIN FRG, pages 124-129, XP002050737 | 1, 2, 10, 12 |
| A | see the whole document | 3-9, 11, 13 |
| | --- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 1997

Date of mailing of the international search report

14/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 97/04396

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| T | <p>C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 94, no. 17, 1997, BETHESDA MD USA, pages 9481-9486, XP002050738</p> <p>see page 9481, column 1, line 1 - column 2, line 19</p> <p>-----</p> | 1-13 |